

2. 培養のための培養・基礎知識

のMEMは、高圧滅菌用として、ビタミンB群を安定にするためにコハク酸でpHを4-4.25にして滅菌するよう処方された動物培養液であるが(2-3-3項のb参照)、特別に処方されていないでもグルタミンとNaHCO₃以外は高圧滅菌可能である。細胞の培養液作製以来、糖を含んだ培地の滅菌には115℃10分の滅菌が用いられているが、121℃10分の滅菌でもとくに支障はない。

培養液の滅菌は糖の濃度を極めて低い、高圧滅菌は圧力が低下してから突然に注ぎ込んで殺菌する。高圧滅菌が材料に熱れるのを防ぐときは高圧の容器で殺菌して行う。

b. 滅菌滅菌

特別な事情がない限り、現在ではノンプランフィンによる滅菌を行う。滅菌水の0.2μmのポリカーボネイトやセルロースアセテート、ナイロン製のフィルターを用いる。さまざまな形の滅菌液が市販されているので、滅菌する型、培地の性質などにより、滅菌の材質や器具を選択する。一般に少量の培地を使用する場合は高圧滅菌の再使用可能な器具がよい。少量のものは滅菌するの使い捨てのものを使用するのが便利である。

2-3-6 培地の試験

a. 培養試験

培地を滅菌試験したときは、滅菌が完了した時点で、ノンプランフィンに溶かしわたり小瓶がないのを確認する。滅菌初期・滅菌・終わりの少なくとも3点から検体を3mlずつ取り、10mlの滅菌試験用オグロブリン・ブローチにインキュベーションを加える。2個の培地を用い、1個は35.5℃で3日間、ほかの1個は20℃で14日間観察する(2-13項のb参照)。いずれにせよ、少量の培地を取り検査では完全に無菌状態を証明できないので、培地の作製に当たっては、菌のロットが完全にないという新しい培地をつくり、新しい培地を古い培地と並行して用いて無菌性を確かめることが必要である。また、このことは、新たにつくった培地の良・不良や成分の欠落を判定するうえにも大切である。真菌の培養はゆっくりであり、アミノ酸・ビタミンの不良も顕微鏡が出るまでに1週間あるいはそれ以上かかるものがあるので、新しいロットを早めにつくることが望ましい。

培地を高圧滅菌するときは、滅菌時の温度・滅菌時間をモニターするかチェックする。無菌試験は滅菌試験した培地に準じて行う。

b. 培養試験

高圧の培養培地は、メーカーでロットごとに試験されているはずである。しかし、ロットごとに多少の差があるので、ロットが変化したときは培養試験をするのが望ましい。また、滅菌時に毒性物質(たとえば高濃度の塩)が混入することがある。自分の研究室で培養して作製するときも、滅菌液のロットが変化したときは培養試験をする。結果には研究室で検定している。性質のよくわかった細菌系を用いる。試験方法としては、1)コロニー形成率(plating

2-3 培地および培養の試験

efficiency, 3-4項参照)。2)増殖曲線(growth curve: 3-4項参照)がある。もし特別な状態をもった細菌株を使用している場合は、その状態を再現しているかどうか調べる。

2-3-4 細胞分注などそのほかの培養の調整と滅菌

a. 0.2% フェノールレッド液

フェノールレッド(Ph) 1gを0.1M NaOH 40mlに溶かし、蒸留水を加えて500mlとする。滅菌して4℃に保存する。室温に保存するときは2mlのクロホルムを加える。これを所定1lに2-10ml加える。最終濃度0.005%くらいまでは毒性がないが、pHを判定できるなま少し高いほうがよい。

b. 1.5% NaHCO₃液

NaHCO₃ 7.5gを高圧滅菌(2-3-4項のa参照)し、滅菌蒸留水に溶かして全量100mlとし、ねじ口瓶に分注して、ロをきつく密閉して保存する。

滅菌として7.5gのNaHCO₃を滅菌水に溶かして、全量を100mlとし、ねじ口瓶に分注して、ロをきつく密閉して高圧滅菌してもよい。

c. トリプシン液

トリプシン1:250 (Difco) 2.5gをCMF-PBS(2-3-2項のb参照)に溶かし1lにする。トリプシンは溶けにくいので、4℃で1晩溶解する。NaOHを加えてpHを8.0にし、4℃で1晩溶解すると溶けやすい。滅菌直前に、HClでpHを7.2に調整する。しかし、pHを調整しなくても使用に耐える。ノンプランフィンで滅菌する前に、滅菌を省く滅菌を通じた滅菌液(10000 rpm 10分)で滅菌した上清を滅菌する。目的に応じて、0.05-0.25%の濃度で使用する。

培地製薬より既製品として結晶トリプシン(トリプシリン)が溶出した凍結乾燥剤として販売されているので、CMF-PBSに溶解して、そのまま使用することができる。1アンプル10000 Uと1バイアル100000 Uの製品がある。後代培養には200-800 U/ml。初代培養では800-1000 U/mlとし、単独あるいはEDTAを加えて使用する。室温では急速に失活するので、凍結後保存する場合は必ず凍結保存する。

d. 2% 中性 EDTA (ethylenediamine tetraacetate) 液

EDTA・2NaまたはVersene (EDTA・4Na) 2gを蒸留水に溶かし、HClを用いてpH 7.4にし、蒸留水で100mlとする。高圧滅菌する。CMF-PBS、または0.05-0.1%トリプシン培地に1/100量加え、0.02% EDTAの濃度で使用する。

e. ディスパーゼ液

細胞中核プロテアーゼ(ディスパーゼ、合同酒造:資料p.1参照)は、中性・非毒性アミノ酸のアミノ基のペプチド鎖を切断する金属酵素である。血清やカルシウムを含む培養液中でも活性があるので、細胞をいために分散することができ、初代培養のための細胞分散、融合した細胞表面からの細胞の

REFERENCE DOCUMENT

Reference document 1:

Title: Introduction to Cell Engineering

Published by: CORONA PUBLISHING CO., LTD., in 1994

Authors: Hiroki Murakami, Takuya Sugawara

(Partially excerpted from page 68)

3.3.3 Preparation of trypsin solution

When collecting adhesive cells for subculturing or experiments, trypsin is generally used to detach such adhesive cells. We dissolve in 0.02% EDTA-PBS a product called Trypsillin which is a lyophilized product of a trypsin derived from bovine pancreas and produced by Mochida Pharmaceutical Co., Ltd. The 0.02% EDTA-PBS is prepared using EDTA-2Na and PBS (-) including neither Mg^{2+} nor Ca^{2+} , and is autoclaved before use.

Since the Trypsillin is a sterilized product, there is no need to filtrate the same for sterilization when dissolved in the 0.02% EDTA-PBS which has been sterilized. Such Trypsillin contains 10,000 units of trypsin in a vial, and is dissolved in the 0.02% EDTA-PBS of 50 mL, thus preparing a solution of 200 units/mL. The solution thus obtained remains usable for a month when preserved at 4°C, and will be newly prepared when the potency thereof has decreased.

Reference document 2:

Title: Tissue Culture Technique (Basics)

Published by: Asakura Publishing Co., Ltd., in 1999

Authors: The Japanese Tissue Culture Association

(Partially excerpted from page 23)

c. Trypsin Solution

Trypsin 1:250 (Difco) of 2.5g is dissolved in CMF-PBS (see b in section 2-3-2) so as to obtain a solution of 1L. Since trypsin is not easily dissolved, the solution thus obtained is stirred overnight at 4°C. Particularly, trypsin is easily dissolved, if NaOH is added to the aforementioned solution to adjust the pH thereof to 8.0 before stirring such solution overnight at 4°C. The pH of a solution thus obtained is adjusted to 7.2 with HCl before filtration. However, the solution thus obtained is still usable even if the pH thereof is not adjusted. Before filtrating for sterilization with a membrane filter, filtration sterilization is performed on either a filtrate obtained by filtrating the solution prepared so far with a general filter paper, or a supernatant obtained by centrifugally separating the solution prepared so far for 10 minutes and at a speed of 10,000rpm. A trypsin solution prepared in this manner is used in the range of 0.05-0.25% in accordance with the intended use.

A crystallized trypsin (Trypsillin) is available from Mochida Pharmaceutical Co., Ltd. as a pharmaceutical product, such crystallized trypsin being provided particularly as a sterilized lyophilized product. In this sense, such crystallized trypsin can be readily used when dissolved in CMF-PBS. There are provided a Trypsillin of 10,000U contained in an ampule, and a Trypsillin of 100,000U contained in a vial. A trypsin solution of 200-800U/mL is used for subculturing, while a trypsin solution of 800-1000U/mL is used for primary culturing. Such trypsin solution can be used alone or with EDTA added thereto. The trypsin solution is rapidly deactivated at room temperature. Thus, the trypsin solution must be frozen for preservation when desiring to preserve the same after the Trypsillin has been dissolved.

End of Draft